

Detecção molecular e análise filogenética da sequência parcial do gene da proteína do capsídeo do vírus da faixa das nervuras do morangueiro

Catarina Corrêa Puttkammer¹, Julia Zappellini², Gustavo Henrique Ferrero Klabunde³ e Miguel Pedro Guerra⁴

Resumo – O morango cultivado (*Fragaria x ananassa* Duch. (Rosaceae) é um híbrido originado pelo cruzamento das espécies americanas *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana* e pertence à família Rosaceae. O morangueiro possui reprodução vegetativa e, por isso, é comum o acúmulo de viroses e outras doenças de difícil controle. Uma das quatro viroses mais importantes na cultura do morango é causada pelo vírus da faixa das nervuras (*Strawberry vein banding virus* – SVBV), que é transmitido no campo por afídeos, de maneira semipersistente. Para melhorar o conhecimento genômico, são recomendadas técnicas moleculares e a classificação de isolados de SVBV. Um dos determinantes primários da transmissibilidade e especificidade por afídeos é a proteína do capsídeo, que possui importância crítica para o estabelecimento da infecção. Neste trabalho, foi sequenciada parcialmente a proteína do capsídeo do gene do SVBV de um isolado alemão, inoculado em morangueiros e mantido em casa de vegetação no Brasil, por mais de dez anos. Foi realizada a análise filogenética comparando as sequências contidas no GenBank com o objetivo de elucidar as relações evolutivas nesta espécie. As análises filogenéticas mostraram que a sequência do isolado está mais próxima dos isolados dos EUA e Egito. Estes resultados contribuem para a melhor elucidação dos mecanismos de evolução do vírus e do patossistema em questão.

Termos para indexação: *Caulimovirus*; Filogenia; *Neighbor-joining*; SVBV; Detecção de vírus

Molecular detection and phylogenetic analysis of partial sequence of *Strawberry vein banding virus* coat protein gene.

Abstract – The cultivated strawberry, *Fragaria x ananassa* Duch. (Rosaceae) is a hybrid from the crossing of American species *Fragaria chiloensis* and *Fragaria virginiana*, belonging to the Rosaceae family. Strawberry plants have vegetative reproduction and, therefore, it is common the propagation of viruses and other diseases. One of the four most important viruses in strawberry is the *Strawberry vein banding virus* (SVBV), which is transmitted by aphids in a semi-persistent manner. Molecular techniques are recommended to improve genome knowledge and classification of the SVBV isolates. The coat protein (CP) is a primary determinant of aphid transmissibility and specificity, critically important to infection establishment. In the present work, we sequenced the SVBV coat protein partial gene of a German strain, inoculated in strawberry plants maintained in green house in Brazil for ten years. It was performed phylogenetic analysis comparing to SVBV coat protein sequences from the GenBank database. Aiming to elucidate evolutionary relationships in this species, phylogenetic analysis showed that our SVBV sequence is closely related to USA and Egypt virus strains. These results will contribute to a better elucidation of evolutionary mechanisms and the SVBV-strawberry pathosystem in question.

Index terms: *Caulimovirus*; Phylogeny; *Neighbor-joining*; SVBV; Virus detection.

Introdução

O morango cultivado, *Fragaria x ananassa* Duch. (Rosaceae) é um híbrido proveniente do cruzamento das espécies americanas *Fragaria chiloensis* x *Fragaria virginiana* ($2n = 8x = 28$) (EDGER et al., 2019). Dentre os países sul-americanos de maior produção desta fruta, juntamente com Chile e Argentina, o Brasil possui cerca de 4.200 hecta-

res de área cultivada e produção anual de aproximadamente 150 mil toneladas (ANTUNES & PERES, 2013; FAGHERAZZI et al., 2016). No Brasil, o maior produtor de morango é o estado de Minas Gerais (SILVEIRA & GUIMARÃES, 2014). Na safra de 2017/2018, em Santa Catarina, foram colhidas 8,6 mil toneladas de morango em 254 hectares de produção (EPAGRI, 2020).

As viroses constituem um dos mais

importantes problemas fitossanitários na produção de mudas e no cultivo de morangueiro, especialmente em decorrência da reprodução vegetativa, na forma de estolões (PANATTONI et al., 2013). Em infecções simples, as viroses podem resultar em 30% de danos à produção. Já em infecções mistas, as quais são as mais abundantes, esses danos podem chegar a até 80% (THOMPSON et al., 2003). O principal método ▶

Submetido em 4/2/2021. Aceito para publicação em 19/5/2021.

<http://dx.doi.org/10.52945/rac.v34i2.1115>

¹ Engenheira-agrônoma, M.Sc., UFSC/Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Rod. Admar Gonzaga, 1346 - Itacorubi, Florianópolis - SC, 88034-000 e-mail: cputtkammer@gmail.com.

² Engenheira-agrônoma, M.Sc., UFSC/Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, e-mail: juzapp@gmail.com.

³ Engenheiro-agrônomo, Dr., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, Rod. Antonio Heil, 6800, Itajaí, SC, Fone: (47) 33986300, e-mail: gustavoklabunde@epagri.sc.gov.br.

⁴ Engenheiro-agrônomo, Dr., UFSC/Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais e Pós-graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, e-mail: miguel.guerra@ufsc.br.

de controle dessas doenças é o uso de mudas livres de vírus (BRAHM & OLIVEIRA, 2004). No Brasil, pode-se observar um aumento de 25% na área cultivada e 50% na produção com o uso de novos cultivares e plantas livres de vírus em conjunto com a maior profissionalização do setor de produção de mudas (FAGHERAZZI et al., 2016).

Estima-se que 26 vírus afetem o morangueiro, sendo o vírus da faixa das nervuras do morangueiro (SVBV; espécie *Strawberry vein banding virus*) um dos quatro vírus prevalentes nas principais regiões produtoras do Brasil e do mundo (UENO, 2004). O SVBV é transmitido por afídeos, de maneira semipersistente, principalmente os pulgões da espécie *Chaetosiphon fragaefolli* (TZANETAKIS & MARTIN 2013), podendo causar redução da produção de estolões e das frutas, assim como a deformação das folhas (UENO, 2004; EMBRAPA, 2005a; VASKOVÁ et al., 2006). Os sintomas característicos do SVBV em morangueiro são faixas cloróticas ao longo das nervuras centrais, manchas e estrias nas folhas mais velhas e as folhas jovens nascem deformadas (VASKOVÁ et al., 2006).

O SVBV pertence ao gênero *Caulimovirus* (família Caulimoviridae), apresentando DNA circular de fita dupla com comprimento de ~ 8 kilobases (kb) e que codifica sete fases abertas de leitura (*open reading frames* - ORFs). Dentre as sete ORFs, a ORF1 codifica a proteína do movimento, responsável pelo movimento célula a célula, a ORF2 e a ORF3 codificam as proteínas relacionadas à transmissão por afídeos e a ORF4 codifica o gene da proteína do capsídeo (*coat protein* - CP), cuja função relaciona-se com a transmissibilidade do vírus (DICKISON et al. 2017). A CP é o determinante primário da transmissibilidade e da especificidade de vírus por afídeos, com extrema importância para a ligação e liberação do vírion durante a transmissão (NG & PERRY 2004). As CPs de alguns vírus são importantes para iniciar a infecção pelo movimento célula a célula, por isso se espera que as sequências desses genes possuam alto grau de conservação (DICKISON et al., 2017).

A caracterização molecular, em que um isolado viral ou suas variantes e espécies podem ser diferenciados com base na sequência genômica, é uma fer-

ramenta importante para classificar as espécies virais (TORRICO et al., 2016). Para a detecção de vírus em morangueiro, as técnicas mais utilizadas são a RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) e o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (MARTIN & TZANETAKIS, 2006), embora outros métodos, como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), q-PCR (PCR quantitativo ou em tempo real) e o dot-ELISA, sejam empregados na detecção de outras viroses (FAJARDO & NICKEL, 2014).

A viabilidade de técnicas moleculares para caracterização, como a PCR, baseia-se na baixa variabilidade em bases específicas na região de anelamento dos *primers* (VASKOVÁ et al., 2006). Abordagens filogenéticas são empregadas para comparar a evolução das sequências em genomas virais, elucidando as relações de ancestralidade na espécie e entre elas (JENKINS, 2002; EMBRAPA, 2005b; YANG & RANNALA, 2012). Tais relações evolutivas, comparando-se isolados de distintas localidades geográficas, podem indicar similaridade entre propriedades fitopatológicas, tornando-se importantes ferramentas para estratégias de controle destas doenças (GARCIA-ARENAL et al., 2001; DICKISON et al., 2017).

Neste estudo, comparamos a sequência parcial da CP de um isolado de SVBV alemão com outras sequências de

CP obtidas no GenBank, a fim de elucidar relações evolutivas através de inferências filogenéticas.

Material e métodos

Os morangueiros infectados com o SVBV tiveram origem na Alemanha e foram mantidos em casa de vegetação, propagados vegetativamente via estolões durante dez anos para a realização de estudos. Sintomas pouco evidentes foram observados nas folhas, como manchas cloróticas nas margens das nervuras, especialmente próximo à nervura central (Figura 1).

O RNA foi extraído dos tecidos foliares (cerca de 100g) de plantas infectadas de morangueiro usando o Kit® RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, após a maceração inicial em nitrogênio líquido e a homogeneização com 3,5 µl de β-mercaptoetanol e o tampão de lise celular. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific*, Califórnia, EUA), e a qualidade foi avaliada através de eletroforese em gel desnaturante de agarose (1%). Amostras de RNA que apresentavam baixas relações espectrofotométricas (relações 260/280 e 260/230) foram precipitadas em etanol (3:1, v/v) e acetato de sódio 3 M (C₂H₃NaO₂), e ressuspensas em água tra-



Figura 1. Plantas infectadas com o vírus da faixa das nervuras do morangueiro apresentando sintomas de manchas cloróticas nas margens das nervuras, especialmente próximo à nervura central Foto: Catarina Corrêa Puttkammer
Figure 1. Plant infected with Strawberry vein banding virus (SVBV) showing chlorotic spots Photo: Catarina Corrêa Puttkammer

tada com dietilpirocarbonato (DEPC). Após digestão do DNA, realizada com o Kit Turbo™ DNase (Life Technologies®, Califórnia, EUA), o cDNA foi construído com o kit GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega®, Wisconsin, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Dois pares de *primers* foram desenvolvidos para amplificação em PCR, um com base na sequência da CP de cinco isolados de SVBV disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e outro nas sequências obtidas neste trabalho (Tabela 1). As reações de PCR foram constituídas de 1x tampão de PCR, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 0,3 μM de cada primer (*forward* e *reverse*), 1 U de Taq DNA polimerase (Quatro G, Porto Alegre, Brasil), cDNA à 30 ng/μL, para um volume final de 20 μL. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de amplificação de PCR, com 95°C por 30seg, 30seg na temperatura de anelamento de cada *primer* (Tabela 1), e 72°C por 1 min e 20 seg, com extensão final de 72°C por 15 min. Após verificação em gel de agarose 1,5%, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen®, Hilden, Alemanha).

As reações de sequenciamento bidirecional foram realizadas no sequenciador automatizado ABI 3500 xL (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA), pelo método Sanger (SANGER et al. 1977), usando a tecnologia BigDye Terminator v.3.1 (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os eletroferogramas gerados foram avaliados quanto à qualidade pelo software CLC Genomics Workbench 8.0.1, e editados manualmente. Após, a sequência consenso gerada foi denominada 'SVBV Brazil'.

Após teste de similaridade pela plataforma BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Tabela 2), as sequências similares foram alinhadas ao 'SVBV Brazil' pelo algoritmo ClustalW implementado no software MEGA X (KUMAR et al, 2018), e o alinhamento editado manualmente. A inferência filogenética baseada na sequência nucleotídica da CP do isolado de SVBV foi realizada com o método *Neighbor-joining* pelo softwa-

Tabela 1. *Primers* desenvolvidos para a amplificação dos fragmentos da sequência CP do vírus da faixa das nervuras do morangueiro (SVBV)

Table 1. *Designed primers for amplification of CP sequence fragments of Strawberry vein banding virus (SVBV)*

		Sequência	T. A. (°C) ¹
SVBVCP1 ²	F (5'-3')	AGGAAGARGACGAAGAAA	48
	R (3'-5')	GGTGAGGAAAACCTAGGA	
SVBVCP2	F (5'-3')	CACAATCTCATCAAAGCC	54
	R (3'-5')	CAGACTTGTTCTGCAAT	

¹ T. A. (°C): temperatura de anelamento.

² Acessos do *GenBank* utilizados para o desenho dos *primers*: FM867860; AY605662, AY605663; AY605664; KU366260.

re CLC Genomics Workbench v. 8.0.1, aplicando o modelo de correção de distância K2P (KIMURA-2-PARAMETER; KIMURA 1980), e o suporte nodal estimado com análise de *bootstrap* por 1.000 replicatas. O *Caulimovirus Cauliflower mosaic virus* (CaMV) foi utilizado como grupo externo (HE978788.1).

Após avaliação preliminar da topologia NJ gerada, as distâncias genéticas médias dentro e entre os grupos formados foram calculadas pelo software MEGA-X (KUMAR et al., 2018). Utilizando-se o modelo K2P (KIMURA 1980), as distâncias foram calculadas pela opção de deleção completa de sítios ambíguos (*pairwise deletion option*), gerando um conjunto final de 744 bases.

Resultados e discussão

Sequências de CP são amplamente usadas para a detecção de SVBV em plantas infectadas, tendo como a baixa variabilidade em regiões de anelamento uma característica crucial para obter dados robustos e confiáveis durante a aplicação de técnicas moleculares baseadas em PCR (VASKOVA et al., 2006). A partir dos *primers* desenvolvidos, a sequência parcial do gene CP do isolado (SVBV Brazil) resultou num fragmento de 735 pares de base, o qual foi empregado na inferência filogenética comparando sequências de doze isolados de SVBV de origens geográficas distintas (Tabela 2). Os novos *primers* mostraram-se eficientes para a detecção do SVBV em morangueiro, dada a possibilidade de identificação por similaridade com dados disponíveis em bancos de dados.

A inferência filogenética (Figura 2) mostrou dois cladogramas monofiléticos distintos, corroborados pela medida de dis-

tância genética entre os cladogramas (0,114). O clado formado pelo agrupamento dos isolados de origem do Canadá e da China apresenta maior variabilidade genética interna ($d = 0,0218$) em comparação ao clado formado pelos acessos dos EUA, Egito e Brasil ($d = 0,0008$). Considerando que as entidades virais, aqui representadas pelas informações das sequências, apresentam ancestralidade comum e acumulam variações nucleotídicas ao longo do tempo evolutivo, medidas de distância representam importantes ferramentas para descrição da diferenciação genética dentro e entre grupos topológicos (KALINOWSKI, 2002; STRIMMER & VON HAESLER, 2009).

O agrupamento entre isolados dos EUA e Egito foi previamente reportado com base em árvore NJ (DICKISON et al. 2017). No entanto, diferentemente do exposto no presente trabalho, isolados da China e do Canadá formaram, anteriormente, dois cladogramas distintos (DICKISON et al. 2017), uma diferença que pode ser explicada pelo maior valor de distância genética dentro deste grupo ($d = 0,0218$). Apesar de uma esperada homogeneidade e da baixa variabilidade genética da região CP, tal discrepância sugere uma importante diversidade entre isolados de SVBV de diferentes origens geográficas (MRÁZ et al. 1998; VASKOVA et al. 2006; DICKISON et al. 2017).

Agrupamento e baixa variabilidade genética de isolados de SVBV de origens americana e europeia foram previamente relacionados às distâncias geográficas, indicando a coexistência independente, durante um longo período, entre populações destas duas origens (MRÁZ, 1998). De fato, discute-se que o SVBV seja nativo da América do Norte, ▶

Tabela 2. Acessos do *GenBank* de seqüências do gene da proteína do capsídeo utilizados na análise filogenética do Vírus da faixa das nervuras do morangueiro (SVBV)

Table 2. *GenBank* accessions of coat protein sequences employed in phylogenetic inferences of *Strawberry vein banding virus* (SVBV)

Acessos <i>GenBank</i>	Vírus	Autor	Origem	% Identidade
KX950837	SVBV	Dickison et al, 2017	Canadá	90,61
KX950838	SVBV	Dickison et al, 2017	Canadá	90,34
KX950839	SVBV	Dickison et al, 2017	Canadá	90,34
KX950840	SVBV	Dickison et al, 2017	Canadá	90,35
KX950841	SVBV	Dickison et al, 2017	Canadá	90,34
KX950842	SVBV	Dickison et al, 2017	Canadá	90,48
KX950843	SVBV	Dickison et al, 2017	Canadá	90,20
FM867860	SVBV	Jiang, 2008	China	88,44
AY605662	SVBV	Vaskova et al, 2004	EUA	100
AY605663	SVBV	Vaskova et al, 2004	EUA	99,86
AY605664	SVBV	Vaskova et al, 2004	EUA	100
KU366260	SVBV	Sofy, 2015	Egito	99,86
HE978788	CaMV	Pourrahim & Farzadfar, 2012	Iran	N/A

N/A (Não se aplica). Acesso usado como *outgroup*.

tendo sido introduzido na Europa e no Brasil, provavelmente, por materiais de propagação vegetal (FRAZIER & MORIS, 1987; MRÁZ, 1998). No entanto, propõe-se que a variabilidade genética do SVBV possa ser maior que o esperado, podendo demandar estudos de correlação entre variabilidade genética associada a patogenicidade viral e capacidade de resistência (TORRICO et al., 2016; DICKISON et al., 2017).

A variação genética em vírus de plantas pode ocorrer de duas formas, mutação e recombinação, sendo estas propriedades intrínsecas dos organismos vivos (GARCIA-ARENAL et al., 2001). Estudos sobre as relações evolutivas em isolados de diferentes origens geográficas podem elucidar as similaridades em propriedades patogênicas e biológicas, tornando-se, assim, uma forte ferramenta na fitopatologia e no desenvolvimento de estratégias para o controle de doenças virais (GARCIA-ARENAL et al., 2001; DICKISON et al., 2017).

Dado que esta virose não apresenta sintomas diagnósticos específicos, como manifestação de manchas cloróticas foliares e severidade variada, a detecção de propágulos infectados por técnicas moleculares se faz relevante para o controle de introdução da doença (MRÁZ 1998). Ainda, métodos espe-

cíficos de detecção, como PCR, e a inferência de relações evolutivas entre vírus de diferentes origens, podem determinar os métodos de controle baseados nas potenciais propriedades patológicas e biológicas correlacionadas (DICKISON et al., 2017).

Conclusão

A detecção do isolado SVBV-Brasil foi realizada por métodos moleculares, indicando a viabilidade das técnicas aplicadas.

A inferência filogenética da sequência parcial da CP do SVBV evidenciou o padrão de ancestralidade entre isolados dos EUA, do Egito e do Brasil, indicando baixos valores de distância genética entre eles.

Propõem-se estudos complementares de correlação entre as características biológicas e patológicas dos isolados agrupados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Osmar Nickel, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho), por disponibilizar as plantas infectadas com o isolado de SVBV.

Referências

ANTUNES, L.E.C.; PERES, N.A. Strawberry production in Brazil and South America. *International Journal of Fruit Science*, v.13, n.1-2, p.156-16, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/15538362.2012.698147>.

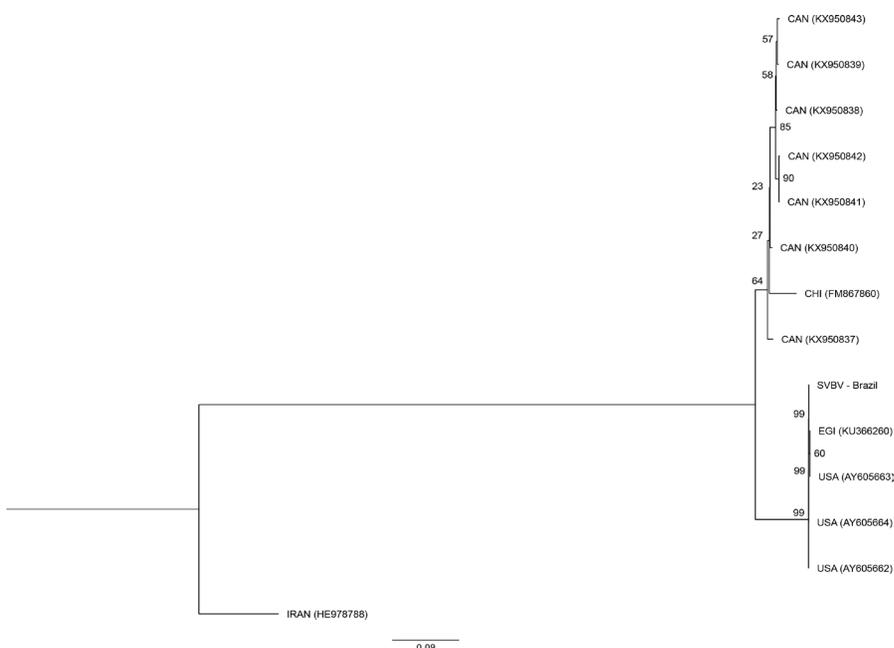


Figura 2. Árvore *Neighbor-joining* baseada na seqüência parcial do gene da proteína do capsídeo do vírus da faixa das nervuras do morangueiro (SVBV). Os valores de *bootstrap* estão demonstrados nos nodos

Figure 2. *Neighbor-joining* tree based on partial coat protein sequence of *Strawberry vein banding virus* (SVBV). Bootstrap values are shown in the nodes

- BRAHM, R.U.; de OLIVEIRA, R.P. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p.507-510, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000300032>.
- DICKISON, V.; MACKENZIE, T.D.B.; SINGH, M.; LAWRENCE, J.; NIE, X. Strawberry vein banding virus isolates in eastern Canada are molecularly divergent from other isolates. **Archives of Virology**, v.162, n.6, p.1777-1781, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3252-1>.
- EDGER, P.P.; POORTEN, T.J.; van BUREN, R.; HARDIGAN, M.A.; COLLE, M.; MCKAIN, M.R.; SMITH, R.D.; TERESI, S.J.; NELSON, A.D.L.; WAI, C.M.; ALGER, E.I.; BIRD, K.A.; YOCCA, A.E.; PUMPLIN, N.; OU, S.; BEN-ZVI, G.; BRODT, A.; BARUCH, K.; SWALE, T.; SHIUE, L.; ACHARYA, C.B.; COLE, G.S.; MOWER, J.P.; CHILDS, K.L.; JIANG, N.; LYONS, E.; FREELING, M.; PUZEY, J.R.; KNAPP, S.J. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. **Nature Genetics**, v.51, p.541-547, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0356-4>.
- EMBRAPA. **Sistema de produção de morango para mesa na região da Serra Gaúcha e encosta superior do Nordeste**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, RS. 2005a.
- EMBRAPA. **Documentos 137: Marcadores moleculares e análise**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22 p., 2005b.
- EPAGRI. **Morango semi-hidropônico: como funciona o cultivo suspenso**. 2020. Disponível em: <https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/2020/10/08/morango-semi-hidropnico-como-funciona-o-cultivo-suspenso/>. Acesso em: 21 maio 2021.
- FAGHERAZZI, A.F.; GRIMALDI, F.; KRETZSCHMAR, A.A.; MOLINA, A.R.; GOLÇALVES, M.A.; ANTUNES, L.E.C.; BARUZZI, G.; RUFATO, L. Strawberry production progress in Brazil. **International Strawberry Symposium**, 8, Quebec. **Proceedings** [...]. p. 937-940, 2016. DOI: <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1156.138>.
- FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. Simultaneous detection of four viruses affecting apple and pear by molecular hybridization using a polyprobe. **Ciência Rural**, v.44, n.10, p.1711-1714, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131629>.
- FRAZIER, N.W.; MORRIS, T.J. **Strawberry vein banding**. *Virus Diseases of Small Fruits*. R. H. Converse, ed. U. S. Dep. Agric. Handb. No. 631, 1987.
- GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, n.1, p.157-186, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.157>.
- JENKINS, G.M.; RAMBAUT, A.; PYBUS, O.G.; HOLMES, E.C. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. **Journal of Molecular Evolution**, v.54, n.2, p.156-165, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0064-3>.
- KALINOWSKI, S.T. Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. **Molecular Ecology**, v.11, n.8, p.1263-1273, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01520.x>.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v.16, n.2, p. 111-120, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n.7, p.1870-1874, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- MARTIN, R.R.; TZANETAKIS, I.E. Characterization and Recent Advances in Detection of Strawberry Viruses. **Plant Disease**, v.90, n.4, p.384-396, 2006. DOI: [10.1094/PD-90-0384](https://doi.org/10.1094/PD-90-0384).
- MRÁZ, I.; PETRZIK, K.; SIP, M.; FRÁNOVÁ-HONESTSLEGROVÁ, J. Variability in coat protein sequence homology among American and European sources of strawberry vein banding virus. **Plant disease**, v.82, n.5, p.544-546, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.5.544>.
- NG, J.C.K.; PERRY, K.L. Transmission of plant viruses by aphid vectors. **Molecular Plant Pathology**, v.5, n.5, p.505-511, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>.
- PANATTONI, A.; LUVISI, A.; TRIOLO, E. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.11, n.1, p.173-189, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2013111-3201>.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- SILVEIRA, G.S.R.; GUIMARÃES, B.C. Aspectos sociais e econômicos da cultura do morangueiro. **Informe Agropecuário**, v.35, n.279, p.7-10, 2014.
- STRIMMER, K., von HAESELER, A. Genetic distances and nucleotide substitution models. *In*: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.-M. (Eds.). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido, 2009. p.41-111.
- THOMPSON, J.R.; WETZEL, S.; KLERKS, M.M.; VASKOVÁ, D.; SCHOEN, C.D.; SPAK, J.; JELKMANN, W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. **Journal of Virological Methods**, v.111, n.2, p.85-93, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00164-2).
- TORRICO, A.K.; CELLI, M.G.; CAFRUNE, E.E.; KIRSCHBAUM, D.S.; CONCI, V.C. Genetic variability and recombination analysis of the coat protein gene of Strawberry mild yellow edge virus. **Australasian Plant Pathology**, v.45, n.4, p.401-409, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0426-3>.
- TZANETAKIS, I.E.; MARTIN, R.R. Expanding field of strawberry viruses which are important in North America. **International Journal of Fruit Science**, v.13, n.1-2, p.184-195, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/15538362.2012.698164>.
- UENO, B. Manejo integrado de doenças do morango. **2º SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO**, p.70-76, 2004. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 123).
- VASKOVÁ, D.H.; SPAK, J.; KLERKS, M.M.; SCHOEN, C.D.; THOMPSON, J.R.; JELKMANN, W. Real-time NASBA for detection of Strawberry vein banding virus. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.110, p.213-221, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000015378.27255.12>.
- VASKOVÁ, D.H.; SPAK, J.; PETRZIK, K. Variability in sequence of Strawberry vein banding virus. **Biologia Plantarum**, v.50, n.4, p.660-666, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0103-4>.
- YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v.13, n.5, p.303-314, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg3186>. ■